

УДК615.849.19

©Кондакова, Загребельная

ВЛИЯНИЕ КОМБИНАЦИИ ПЕРОКСИДНЫХ РАДИКАЛОВ С ОКСИДОМ АЗОТА НА СИНТЕЗ ДНК В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

И.В. Кондакова, Г.В. Загребельная

НИИ онкологии Томского научного центра СО РАМН,
Томск 634009, пер. Кооперативный 5.
факс: (3822)514-097; эл. почта: biochem@oncology.tomsk.ru

Исследовано влияние пероксидных радикалов, образующихся из *трет*-бутилгидропероксида (ГПТБ) и 2,2'-азо-бис(2-амидинопропана) (АБАП), соединений, генерирующих оксид азота (NO), и их комбинации на синтез ДНК в клетках асцитной аденокарциномы Эрлиха. Полученные результаты показали наличие концентрационной зависимости действия пероксирадикалов и NO на исследованные процессы. Это выражалось в том, что ГПТБ и АБАП в больших концентрациях ингибировали синтез ДНК. При уменьшении концентрации окислительных агентов в среде инкубации, начиная с 5 нМ для ГПТБ и 100 мкМ для АБАП, происходило снижение цитотоксического действия, непосредственно переходящее в стимуляцию включения [³H]тимидина в ДНК опухолевых клеток. NO-генерирующие соединения - нитрит натрия и нитропруссид натрия, ингибировали синтез ДНК в концентрации 10⁻³ М, а в диапазоне концентраций 10⁻⁵ - 10⁻⁸ М увеличивали включение [³H]тимидина в ДНК. При комбинированном воздействии пероксирадикалов и NO на клетки карциномы Эрлиха обнаружено, что синтез ДНК в них возрастает по сравнению с контрольными клетками, инкубированными только с источниками пероксидных радикалов. L-аргинин проявлял наибольшую активность в плане подавления опухолетоксического действия окислительных агентов. Таким образом, оксид азота может быть фактором, способствующим защите опухолевых клеток от свободнорадикального воздействия.

Ключевые слова: пероксидные радикалы, оксид азота, опухолевые клетки, пролиферация.

ВВЕДЕНИЕ. Активированные кислородные метаболиты, являясь высоко реакционными соединениями, могут вызывать повреждения нуклеиновых кислот, инактивацию ферментов и запуск цепных реакций перекисного окисления липидов [1], что, в свою очередь, приводит к нарушению различных клеточных функций, в частности, ингибированию пролиферации и индукции апоптоза [2-4]. Это послужило причиной широкого использования свободнорадикального воздействия с терапевтической целью в онкологии. По мнению ряда исследователей, механизм действия лучевой терапии и некоторых видов химиопрепаратов, например, антрациклиновых антибиотиков, связан с образованием высокоактивных радикальных молекул, повреждающих опухолевые клетки [5, 6]. Развитие устойчивости опухолевых клеток к лучевой и химиотерапии представляет существенную проблему современной онкологии. В связи с этим целесообразно изучение механизмов развития резистентности опухолей и поиск новых подходов к терапии рака, которые позволят повысить эффективность уже имеющихся методов.

СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ И СИНТЕЗ ДНК В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

Для повышения противоопухолевой эффективности свободно-радикального воздействия на опухолевые клетки было предложено его использование в сочетании с донорами оксида азота (NO) [7]. Авторы считают, что потенцирование оксидом азота свободнорадикального повреждения опухолевых клеток связано с высокой реакционной способностью NO, и это обуславливает дополнительный опухолетоксический эффект. Данное предположение подтверждается работами [8, 9], в которых показано, что генераторы оксида азота или активаторы индуцибельной NO-синтазы ингибируют пролиферацию клеток и индуцируют апоптоз.

Однако, существует прямо противоположное мнение, указывающее на антиоксидантные свойства NO [10, 11]. Противоречивость литературных данных о механизме сочетанного воздействия свободных радикалов и оксида азота не позволяет правильно интерпретировать его эффект и затрудняет оценку в плане перспективного использования для терапевтических целей. Одним из подходов к выяснению механизмов действия свободных радикалов на клеточном уровне может быть использование модельных окислительных систем. Для этих целей широко используются прооксиданты трет-бутилгидропероксид (ГПТБ) и 2,2'-азо-бис(2-амидинопропан) (АБАП) [12, 13], генерирующие пероксидные радикалы.

Целью настоящей работы явилось исследование влияния пероксидных радикалов, NO-генерирующих соединений, а также их комбинации на синтез ДНК в опухолевых клетках.

МЕТОДИКА. Эксперименты проведены на мышах линии С-57В1/6J массой 18-22 г. В работе использовали асцитную карциному Эрлиха, перевиваемую внутривенно. Асцитную жидкость с опухолевыми клетками брали на седьмые сутки после трансплантации опухоли и трижды отмывали средой RPMI-1640. Жизнеспособность клеток определяли с использованием трипанового синего. Свободнорадикальное воздействие вызывали гидропероксидом третичного бутила ("Merck" Германия) и 2,2'-азо-бис(2-амидинопропаном) (АБАП), любезно предоставленным профессором E.Lissi (Университет Сантьяго, Чили). АБАП при термическом разложении ($t = 37^\circ\text{C}$) образует пероксирадикалы [14]. Источниками NO были нитропруссид натрия и нитрит натрия ("Sigma" США), который в ходе циклических реакций превращается в оксид азота [15]. Для эндогенной генерации NO в опухолевых клетках применяли L-аргинин (отечественного производства марки х.ч.). Активность NO-синтазы ингибировали с помощью метилового эфира нитро-L-аргинина (NAME) ("Sigma").

Синтез ДНК в опухолевых клетках изучали по включению меченого радионуклидами предшественника синтеза нуклеиновых кислот [^3H]тимидина ("Изотоп" Россия) в ДНК. После выделения из брюшной полости клетки трижды отмывали средой RPMI-1640 и доводили до конечной концентрации 1 млн/мл. Клетки культивировали в присутствии различных концентраций NO-генерирующих соединений и свободнорадикальных агентов в 96-луночных круглодонных планшетах в объеме 200 мкл. среды культивирования, содержащей среду RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки "Flow", 10 мл NEPEs ("Flow", Англия), 5 mM глутамина (ICN), 40 мкг/мл гентамицина. Во все лунки добавляли по 0,1 мкКи [^3H]тимидина. Планшеты инкубировали 18 часов в атмосфере 5% CO_2 при 37°C . После инкубации клетки переносили с помощью 12-канального сборщика клеток "Flow" на стекловолоконные фильтры, промывая ячейки планшеты физиологическим раствором (200 мл/ряд), холодным 5% раствором трихлоруксусной кислоты (200 мл/ряд) и этиловым спиртом (200 мл/ряд). В высушенных фильтрах измеряли радиоактивность на жидкостном сцинтилляционном счётчике Mark - III ("Tracor Analytic", США) в сцинтилляторе Lumax (Lumac Systems inc., США). Изменение скорости синтеза ДНК выражали в процентах по отношению к контролю.

Полученные данные обрабатывали статистически с использованием непараметрического критерия Вилкоксона-Мана-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Соединения, используемые нами для

индукции свободнорадикального окисления, существенно отличаются друг от друга по структуре, однако, они оба могут служить источниками пероксирадикалов. Показано, что распад ГПТБ происходит при его взаимодействии с внутриклеточными ионами переменной валентности, главным образом, железа и меди с образованием пероксидных радикалов [1]. Термолиз АБАП также приводит к их накоплению [14]. Пероксидные радикалы, образующиеся в суспензии опухолевых клеток, также как и доноры оксида азота, оказывали существенное влияние на включение [^3H]тимидина в опухолевые клетки. ГПТБ и АБАП в больших концентрациях оказывали на популяцию опухолевых клеток цитотоксическое воздействие, которое выражалось в ингибировании скорости синтеза ДНК (рис 1). При уменьшении концентрации окислительных агентов в среде инкубации, начиная с концентрации 5 нМ для ГПТБ и 100 мкМ для АБАП, происходило снижение цитотоксического действия, непосредственно переходящее в стимуляцию включения [^3H]тимидина в клетки карциномы Эрлиха. Максимальные значения включения достигались при концентрациях 0,5 нМ для ГПТБ и 1 мкМ для АБАП.

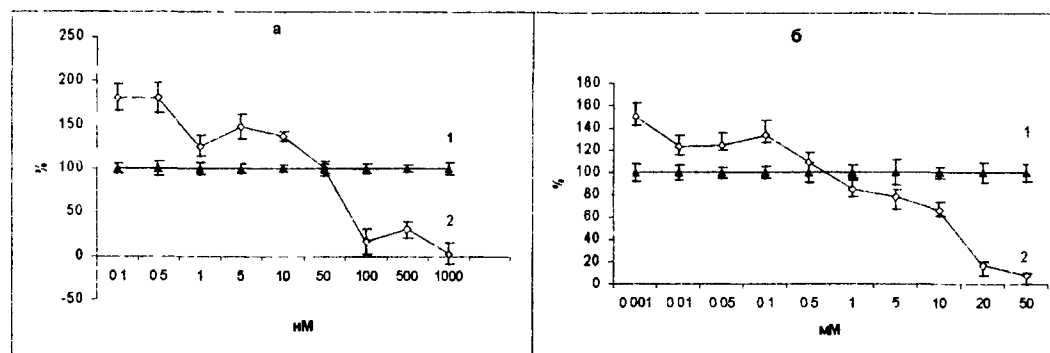


Рисунок 1

Влияние гидропероксида третичного бутила (а) и 2,2'-азо-бис(2-амидинопропана) (б) на включение [^3H]тимидина в ДНК опухолевых клеток (2) по сравнению с контролем (1), результаты выражены в процентах по отношению к контролю

Действие соединений, генерирующих NO экзогенно, на синтез ДНК в опухолевых клетках также зависело от концентрации и характеризовалось противоположной направленностью, хотя их цитотоксический эффект был выражен слабее (рис 2). Нитрит натрия и нитропруссид натрия ингибировали синтез ДНК в концентрации 10^{-3} М, а в диапазоне концентраций 10^{-5} - 10^{-8} М увеличивали включение [^3H]тимидина в ДНК. Оксид азота, эндогенно синтезируемый из L-аргинина в NO-синтазной реакции, приводил к незначительному увеличению синтеза ДНК (рис 3). Таким образом, оксид азота, образующийся как из экзогенных источников, так и синтезируемый эндогенно в NO-синтазной реакции, может изменять пролиферативную активность опухолевых клеток. Обращает на себя внимание тот факт, что ингибирование NO-синтазной реакции метиловым эфиром нитро-L-аргинина в опухолевых клетках приводит почти к 50% снижению синтеза ДНК, что также подтверждает гипотезу о важной роли оксида азота в регуляции пролиферации клеток.

Принимая во внимание данные о способности NO взаимодействовать с кислородными радикалами с образованием высокоактивных пероксинитритов [16], можно предположить, что доноры оксида азота будут потенцировать опухолетоксичное действие пероксидных радикалов. Принципиальная возможность реакции между NO и органическими пероксильными радикалами (RO_2) с образованием органических пероксинитритов (ROONO) была показана в работе S. Padmaja [17]. Однако, в наших экспериментах комбинация нетоксических доз продуцентов NO и низкотоксичных доз пероксидных радикалов

СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ И СИНТЕЗ ДНК В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

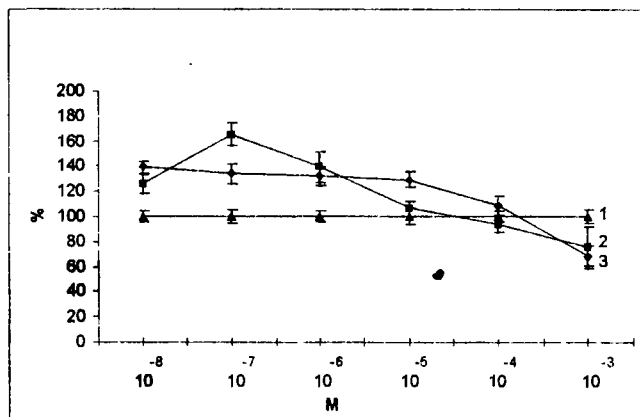


Рисунок 2.

Влияние NO-генерирующих соединений (2 - нитропруссид натрия, 3 - нитрит натрия) на включение [³H]тимидина в ДНК опухолевых клеток по сравнению с контролем (1). Результаты выражены в процентах по отношению к контролю.

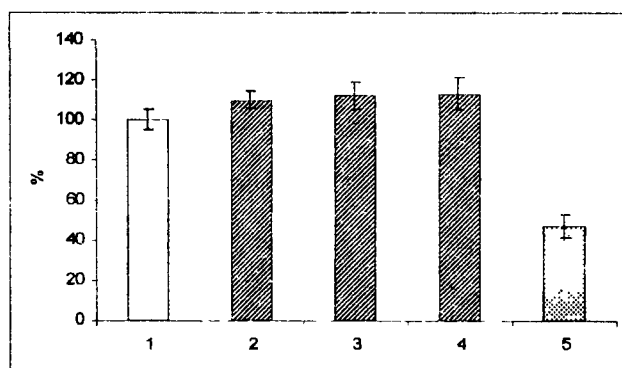


Рисунок 3.

Влияние различных концентраций L-аргинина (2 - 1 мМ, 3 - 5 мМ, 4 - 10 мМ) и 5 мМ метилового эфира нитроаргинина) на включение [³H]тимидина в ДНК опухолевых клеток по сравнению с контролем (1). Результаты выражены в процентах по отношению к контролю.

либо приводила к увеличению включения [³H]тимидина в ДНК по сравнению с контрольной популяцией опухолевых клеток, инкубированных только с источниками пероксидных радикалов, либо не влияла на неё (табл. 1). Причём, из всех NO-генерирующих соединений L-аргинин проявлял наибольшую активность в плане подавления противоопухолевого действия пероксидных радикалов. Эффект потенцирования цитотоксического действия ГПТБ проявлял только нитрит натрия в концентрации 10 нМ.

Для выяснения вопроса, влияет ли NO на ингибирование синтеза ДНК свободными радикалами, были выполнены эксперименты с использованием высоких доз пероксидов. При использовании цитотоксических доз ГПТБ и АБАП действие оксида азота заключалось в снижении их опухолетоксичности (табл.2). Таким образом, оксид азота не только не усиливает токсичность свободнорадикальных агентов, но и защищает опухолевые клетки от их повреждающего воздействия.

Данные, полученные в этой работе, позволяют предположить, что взаимодействие оксида азота с пероксидными радикалами не всегда приводит к образованию цитотоксических продуктов. Это подтверждается работой [17], в которой показано, что если органические пероксинитриты распадаются с образованием органических нитратов, NO может выступать как антиоксидант. Кроме того, NO связывает мембранные и внутриклеточные комплексы железа, что

Таблица 1. Сочетанное действие соединений, генерирующих оксид азота, и субтоксических доз пероксидных радикалов на включение [³H]тимидина (% по отношению к контролю) в клетки карциномы Эрлиха.

	Контроль	Нитропруссид натрия (10 нМ)	Нитрит натрия (10 нМ)	L-аргинин (5мМ)
—	100	155,2±27,1	183,2±30,0	164,9±33
АБАП (10 мМ)	47,3±10,3	52,6±12,1*	43,5±7,1*	88,5±2,3*
АБАП (1 мМ)	57,6±4,2	70,8±12,6*	42±9,8	140±30,6*
ГПТБ (100 нМ)	106,6±5,1	83,2±19,1*	36,8±7,3*	122,3±39,4*
ГПТБ (1мкМ)	42,6±0,9	190±28,3*	35,4±11,2*	98,5±32,6*

Примечание: Здесь и в табл. 2 звездочкой указана достоверность различий по сравнению с контролем - $p < 0,05$.

Таблица 2. Влияние соединений, генерирующих оксид азота, и цитотоксических концентраций пероксидных радикалов на включение [³H]- тимидина (% по отношению к контролю) в клетки карциномы Эрлиха.

	Контроль	АБАП (20 мМ)	ГПТБ (10 мкМ)
—	100	25,1±2,3	7,3±1,7
Нитропруссид натрия, 10 ⁻³ М	52,4±8,5	36,8±8,9*	1,8±0,6*
10 ⁻⁴ М	98,0±13,7	76,9±18,3*	11,6±2,6*
10 ⁻⁵ М	132,1±25,9	118,2±35,3*	8,7±1,1*
Нитрит натрия, 10 ⁻³ М	79,6±19,3	57,4±10,9*	20,6±5,3*
10 ⁻⁴ М	98,2±20,7	102,9±19,0*	8,3±1,8*
10 ⁻⁵ М	148,3±24,8	73,5±15,7*	4,6±2,6
L-аргинин, 5 мМ	185,6±23,8	69,3±14,6*	3,4±1,5

Примечание: * - показатель достоверности различий в сравнении с колонкой "контроль" - $p < 0,05$.

препятствует распаду пероксидов с образованием радикалов и развитию цепных реакций свободнорадикального окисления [10, 18]. Возможно, что антиоксидантные свойства и обуславливают цитопротекторное действие NO.

Наблюдаемый эффект усиления синтеза ДНК в опухолевых клетках может быть как показателем активности системы репарации ДНК, так и отражать пролиферативную активность клеток. В наших экспериментах параллельно с увеличением включения [³H]тимидина в ДНК наблюдался значительный прирост числа опухолевых клеток. Это свидетельствует прежде всего об усилении пролиферативного потенциала карциномы Эрлиха. Таким образом, механизм взаимодействия оксида азота с пероксидными радикалами и реализация их совместного влияния на синтез ДНК в опухолевых клетках представляет собой сложный процесс.

Феномены стимуляции пролиферации опухолевых клеток под действием низких концентраций пероксидных радикалов и NO-генерирующих соединений, а также защиты опухолевых клеток оксидом азота от свободнорадикального токсического действия, являются небезынтересными с теоретической и практической точек зрения. Поскольку реальные популяции опухолевых клеток в организме онкологических больных гетерогенны и изменчивы по многим фенотипическим признакам, нельзя исключить возможности существования клонов клеток в одном опухолевом узле с различным порогом чувствительности к радио- и химиотерапевтическим воздействиям. Вследствие этого, специфическая противоопухолевая терапия может иметь следствием гибель значительной массы опухолевых клеток, но в то же время оказать стимулирующее воздействие на пролиферацию отдельных высокорезистентных клеток, что в конечном итоге

СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ И СИНТЕЗ ДНК В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

может привести к генерализации опухолевого процесса. Оксид азота может являться одним из факторов, способствующих появлению резистентных клонов опухолевых клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров Ю.А. (1998) Вестник РАМН, №7, 43-51.
2. Bessquet F., Goureau O., Soubrane G. et al. (1994) Exp. Cell. Res., **212**, 374-382.
3. Gansauge S., Gansauge F., Gause H. et al. (1997) FEBS Lett., **404**, 6-10.
4. Gorman A., McGowan A., Cotter G. (1997) FEBS Lett., **404**, 27-33.
5. Miura T., Muraoka S., Ogiso T. (1995) Res. Commun. Molec. Pathol. Pharmacol., **87**, 133-143.
6. Miura Y., Anzai K., Urano S. et al. (1997) Free Rad. Biol. Med., **23**, 533-540.
7. Filep J.G., Lapierre C., Lachance S. et al. (1997) Biochem. J., **321**, 897-901.
8. Gansauge S., Gansauge F., Nussler A.K. et al. (1997) FEBS Lett., **410**, 160-164.
9. Glockzin S., Knethen A., Scheffner M. et al. (1999) J. Biol. Chem., **274**, 19581-19586.
10. Juckett M. B., Weber M., Balla J. (1996) Free Rad. Biol. Med., **20**, 63-73.
11. Kammer J., Harel S., Granit R. (1992) Lipids, **27**, 46-49.
12. Kondakova I.V., Peiretti F., Nalbone G. et al. (1995) Biochim. Biophys. Acta, **1258**, 297-302.
13. Frei B., Stocker R., Ames B.N. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **85**, 9748-9752.
14. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е., и др. (1988) Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих., М, Наука.
15. Lissi E., Pascual C., Castillo M. (1992) Free Rad. Res. Commun., **17**, 299-311.
16. Radi R., Beckman J.S., Bush K.M. et al. (1991) J. Biol. Chem., **266**, 4244-4250.
17. Padmaja S., Huie R.E. (1993) Biochem. Biophys. Res Commun., **195**, 539-544.
18. Gorbunov N.V., Yalowich J.C., Gaddam A. et al. (1997) J. Biol. Chem., **272**, 12328-12341.

Поступила 26.03.2002

THE INFLUENCE OF PEROXIDE RADICALS AND NITRIC OXIDE ON DNA SYNTHESIS IN TUMOR CELLS

I.V. Kondakova, G.V. Zagrebelnaya

Institute of Oncology, Kooperativny str 5, Tomsk, 634009 Russia;
fax: (3822)514-097, e-mail: oncology@info.tsu.ru

The influence of peroxide radicals and nitric oxide (NO) on DNA synthesis in mouse Ehrlich's carcinoma cells was studied. Peroxyl radicals were generated from 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) (ABAP) and *tert*-butyl hydroperoxide (t-BHP); NO was formed from sodium nitroprusside, sodium nitrite and L-arginine. The toxic effect of peroxide radicals and NO-generating compounds depended on their concentration in incubation medium. Combinations of NO donors with either ABAP or t-BHP in subtoxic concentrations did not result in marked decrease of tumor cell proliferation. The addition of non-toxic concentrations of NO generators failed or impaired the toxic effect of free radical agents. This protective action of NO may be associated with its antioxidant properties and may defend cancer cells from free-radical damage.

Key words: peroxide radicals, nitric oxide, tumor cells, proliferation.